

10; 0.81, 096
Aug 26, 2004

Optical arrangement in beam path of confocal fluorescence microscope; has mirror in detector beam path to reflect excitation beam and transmit fluorescence from object

Patent number: DE19842153
Publication date: 2000-03-16
Inventor: ENGELHARDT JOHANN (DE); HAY WILLIAM C (DE); ULRICH HEINRICH (DE)
Applicant: LEICA MICROSYS HEIDELBERG GMBH (DE)
Classification:
- International: G02B21/00
- European: G01N21/64P, G02B21/00M4A
Application number: DE 19981042153 19980915
Priority number(s): DE 19981042153 19980915

Also published as:

WO0016149 (A1)

EP1031055 (A1)

Abstract of DE19842153

A mirror (13) is included in a detector (11) beam path (5). The mirror is arranged in the illumination and detection beam path (3-5) and dimensioned so that it reflects non-diverging excitation beam from a laser source (1,2) for dark field illumination, and transmits fluorescence from the object, with a full numerical aperture in the direction of the detector but reduced by the effective cross-section of the mirror in the detection beam path.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 198 42 153 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/00

DE 198 42 153 A 1

(21) Aktenzeichen: 198 42 153.2
(22) Anmeldetag: 15. 9. 1998
(43) Offenlegungstag: 16. 3. 2000

(71) Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120
Heidelberg, DE
(74) Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

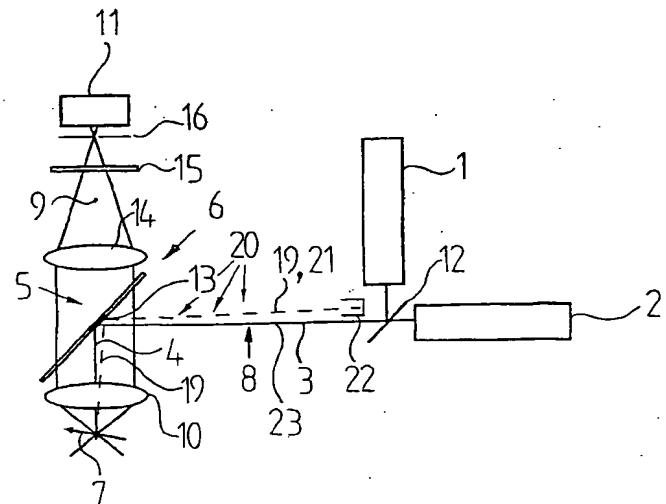
(72) Erfinder:
Ulrich, Heinrich, Dr., 69121 Heidelberg, DE;
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;
Hay, William C., 69493 Hirschberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt.

(54) Optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops

(57) Eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle (1, 2), einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) angeordneten Einrichtung zur Trennung des Anregungslichts (8) von dem Fluoreszenzlicht (9), einem zwischen der Einrichtung und dem Objekt (7) angeordneten Objektiv (10) und einem der Einrichtung im Detektionsstrahlengang (5) nachgeordneten Detektor (11), ist zur Erhöhung der Fluoreszenzausbeute bei einfacher Bauweise, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung einen Spiegel (13) umfaßt und daß der Spiegel (13) im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts (7) den von der Laserlichtquelle (1, 2) kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungstrahl in das Objektiv (10) reflektiert und das vom Objekt (7) kommende Fluoreszenzlicht (9) mit voller numerischer Apertur - vermindert um den im Detektionsstrahlengang (5) wirksamen Querschnitt des Spiegels (13) - in Richtung des Detektors (11) passieren läßt.



DE 198 42 153 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle, einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordneten Einrichtung zur Trennung des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht, einem zwischen der Einrichtung und dem Objekt angeordneten Objektiv und einem der Einrichtung im Detektionsstrahlengang nachgeordneten Detektor.

Aus der Praxis ist es bereits seit Jahren bekannt, zur Trennung des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht dichroitische Strahlteiler zu verwenden. Bei der simultanen Mehrfarbanwendung finden entsprechend mehrfach dichroitische Strahlteiler Anwendung. Das vom reflektierten Anregungslight befreite Fluoreszenzlicht wird – nach Trennung mittels Strahlteiler – mittels eines besonderen Detektors detektiert. Die in der Praxis verwendeten Strahlteiler sind im allgemeinen teuer. Darüberhinaus eignen sich diese Strahlteiler für quantitative Vergleichsmessungen hoher Präzision und hoher Meßdynamik nur wenig, zumal diese Strahlteiler u. a. auch temperaturabhängig sind. Darüberhinaus weisen dichroitische Strahlteiler Transmissionsverluste von etwa 10% für die Detektion auf.

Würde man bspw. einen wellenlängenunabhängigen Strahlteiler einsetzen, würde dies die Kosten zweifelsohne herabsetzen. Nachteilig wäre hierbei jedoch, daß man dabei das Streulicht des Anregungslichts vor der Detektion herausfiltern muß, bspw. durch Einsatz eines Sperrfilters. Dies ist wiederum in baulicher Hinsicht aufwendig und verursacht abermals Kosten. Außerdem wird dadurch die Fluoreszenzausbeute verringert. Simultane Mehrfarbanwendungen sind dann jedoch nicht möglich.

Bei Verwendung eines einfachen Strahlteilers gelangt zudem ein Streulichtreflex des Anregungslichts zurück in die Laserlichtquelle und stört die dort stattfindende stimulierte Emission, was sich wiederum durch unerwünschte Intensitätsschwankungen des Laserlichts bemerkbar macht.

Für höchstauflösende Anwendungen nutzt man zur Beleuchtung bzw. zum Scannen die gesamte numerische Apertur. Dies führt zu einem Beleuchtungsfokus, der in lateraler Richtung sehr klein ist, so daß längere Aufnahmezeiten erforderlich sind. Für Anwendungen, bei denen die Auflösung eine untergeordnete Rolle spielt, ist diese Vorgehensweise aufgrund der längeren Aufnahmezeiten nachteilig.

Hinsichtlich der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird lediglich beispielhaft verwiesen auf Engelhardt und Knebel in "Physik in unserer Zeit", 24. Jahrg., 1993, Nr. 2 "Konfokale Laserscanning-Mikroskopie" und D.K. Hamilton und T. Wilson in Appl. Phys. B 27, 1982, 211–213 "Three-Dimensional Surface Measurement Using the Confocal Scanning Microscope".

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops derart auszustalten und weiterzubilden, daß gegenüber der gattungsbildenden Anordnung mit herkömmlichem dichroitischem Strahlteiler eine Erhöhung der Fluoreszenzausbeute bei einfacher Bauweise realisierbar ist.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 1. Danach ist die eingangs genannte optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung einen Spiegel umfaßt und daß der Spiegel im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang derart angeordnet und dimensioniert

ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit voller numerischer Apertur 5 – vermindert um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels – in Richtung des Detektors passieren läßt.

In erfindungsgemäßer Weise ist zunächst erkannt worden, daß die Einrichtung einen Spiegel umfaßt und daß der Spiegel im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit 10 voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels – in Richtung des Detektors passieren läßt.

Erfindungsgemäß ist weiter erkannt worden, daß es sich bei der Einrichtung zum Trennen des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht – anstelle eines herkömmlichen dichroitischen Strahlteilers – um einen Spiegel handeln kann, der im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordnet ist. Dieser Spiegel ist dabei derart – hinreichend klein – zu dimensionieren, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit voller numerischer Apertur in Richtung des Detektors passieren läßt, wobei das Fluoreszenzlicht um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels vermindert ist. Der vom Objekt reflektierte Hauptflex des Anregungslichts wird in vorteilhafter Weise an dem Spiegel aus dem Detektionsstrahlengang herausreflektiert.

Aufgrund der hinreichend kleinen Ausgestaltung des Spiegels bzw. der spiegelnden Fläche wird lediglich der nicht aufgeweitete Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert. Durch die Beleuchtung mit einer derart "kleinen" numerischen Apertur (bspw. 10% der sonst üblichen Apertur) erzielt man eine "Dunkelfeldbeleuchtung", die entlang der optischen Achse einen elongierten Fokusbereich mit einem wohl definierten Fokussdurchmesser lateral aufweist. Erfindungsgemäß wird eine hinreichende Beleuchtungstoleranz in der Objektlage entlang der optischen Achse erreicht, v. 35 sich auf spezielle Anwendungen in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie besonders günstig auswirkt. Des weiteren ist eine Beleuchtung mit einer hohen intraszenischen Dynamik gewährleistet. Der Vorteil einer solchen hohen intraszenischen Dynamik liegt darin, daß bspw. zwei unmittelbar benachbarte Objekte unterschiedlicher absoluter Fluoreszenzintensität, z. B. Objekt A mit 100% und Objekt B mit 40 0,05%, in der gleichen Konfokalebene ohne "Überleuchten" des helleren Objekts voneinander meßbar sind.

In besonders vorteilhafter Weise ist der Spiegel derart dimensioniert bzw. klein ausgestaltet, daß er für das zu detektierende Fluoreszenzlicht im Detektionsstrahlengang einen Verlust von etwa 1% hervorruft. Dies ermöglicht eine effiziente Detektion mit besonders hohem Dynamikbereich.

Der hier verwendete Spiegel könnte im Rahmen einer besonders einfachen Ausführungsform als unabhangiges Bauteil ausgeführt sein, wobei der Spiegel wiederum von einer Halterung getragen ist. Im Rahmen einer solchen Ausgestaltung entfällt der Einsatz eines herkömmlichen Strahlteilers vollkommen, da hier nämlich im Strahlengang an entsprechender Stelle lediglich der kleine Spiegel angeordnet ist. Im Rahmen einer weiteren Alternative könnte der Spiegel als vorzugsweise integraler verspiegelter Bereich eines – ansonsten herkömmlichen – Strahlteilers ausgeführt sein, wo-

bei der Spiegel bzw. der verspiegelte Bereich zumindest weitgehend in der Mitte des Strahlteilers angeordnet bzw. ausgebildet ist. Dieser kleine – integrale – Spiegel könnte in etwa rund oder elliptisch bzw. oval ausgebildet sein. Letztendlich handelt es sich hier um einen verspiegelten Bereich in der Mitte eines Strahlteilers, der ebenso wie ein isolierter Spiegel den nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert. Auch hier findet die Beleuchtung mit einer äußerst kleinen numerischen Apertur zur Begünstigung der Dynamik statt.

Der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers könnte in Richtung des Detektors in etwa 10% Reflexion und 90% Transmission aufweisen. Dabei könnte es sich im Konkreten um eine Anti-Reflex(AR)-Beschichtung auf der dem Detektor zugewandten Seite des Strahlteilers handeln. Dieser Strahlteiler lässt das Fluoreszenzlicht gemäß dem üblichen – unendlichen – Strahlengang mit der vollen numerischen Apertur – reduziert um das auf den verspiegelten Bereich treffende Fluoreszenzlicht – in Richtung des Detektors passieren. Durch den verspiegelten Bereich entsteht für das zu detektierende Fluoreszenzlicht ein äußerst geringer Verlust, nämlich in Abhängigkeit von der Größe des Spiegels. Hier lassen sich Verluste von lediglich 1% realisieren, was zu der bereits zuvor erwähnten hohen Dynamik führt.

Des weiteren könnte der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers derart ausgestaltet und ggf. beschichtet sein, daß die optischen Eigenschaften des nicht spiegelnden Bereichs des Strahlteilers zumindest weitgehend temperaturunabhängig sind. Die Reproduzierbarkeit der Messung ist dadurch begünstigt.

Nun gelangt vom Objekt aus nicht nur Fluoreszenzlicht in den Detektionsstrahlengang, sondern auch Rückreflexe des Anregungslights. Solche Rückreflexe sind unerwünscht. Zur Unterdrückung der Rückreflexe des Anregungslights am Objekt zurück in die Laserlichtquelle könnte das Objekt schief angeordnet sein. Dies bedeutet, daß das Objekt selbst nicht orthogonal zur optischen Achse angeordnet ist, so daß sich für das rückreflektierte Anregungslight ein separater Strahlengang ergibt, der zum Beleuchtungsstrahlengang zumindest geringfügig – räumlich – versetzt ist. In diesem besonderen Strahlengang lassen sich ohne weiteres herkömmliche Lichtfalle anordnen, um nämlich das rückreflektierte Anregungslight wirksam auszublenden.

Im Falle einer erwünschten Objektverschiebung, bspw. zum Auffinden eines weiteren Objekts, ist es von besonderem Vorteil, wenn das Objekt in seiner Ebene derart bewegbar ist, daß der beleuchtete Objektbereich stets den gleichen Abstand zu dem Objektiv aufweist. Dadurch gelangt das am Objekt reflektierte und/oder gestreute Licht gemäß den voranstehenden Ausführungen nicht zurück in die Laserlichtquelle, sondern über den besonderen Strahlengang in eine Lichtfalle.

Alternativ zu der Vorkehrung einer Lichtfalle könnte der Spiegel – im Rahmen einer Ausgestaltung als isoliertes Bau teil – einen absorbierenden Bereich zur Absorption des vom Objekt gestreuten und/oder reflektierten Anregungslights aufweisen. Die Vorkehrung besonderer Lichtfalle ist dabei nicht mehr erforderlich, wodurch sich eine räumliche Reduktion der Anordnung ergibt. So könnte der Spiegel – im Rahmen einer runden oder elliptischen bzw. ovalen Ausgestaltung – einen spiegelnden bzw. reflektierenden Bereich und einen absorbierenden Bereich aufweisen.

Ebenso ist es möglich, daß der Strahlteiler neben dem verspiegelten Bereich einen absorbierenden Bereich zur Absorption des vom Objekt gestreuten und/oder reflektierten Anregungslights aufweist. Auch im Rahmen einer solchen Ausgestaltung kann die Vorkehrung einer besonderen Lichtfalle entfallen, so daß auch diese Ausgestaltung den Vorteil

in sich birgt, die Anordnung mit geringstem Raumbedarf bauen zu können.

Schließlich ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn durch ein geeignetes Verhältnis von Strahldivergenz zur Wellenlänge der verwendeten Laserlichtquellen eine zumindest annähernd gleiche – axiale – Fokuslage möglich ist. Dadurch ist zum einen die notwendige Beleuchtungstoleranz in der Objektlage entlang der optischen Achse gegeben und ist zum anderen eine Beleuchtung mit einer hohen intraszenischen Dynamik gewährleistet. Hierzu wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf die voranstehenden Ausführungen verwiesen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung von Ausführungsbeispielen der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung den grundsätzlichen Aufbau einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung einen Strahlteiler mit mittigem Spiegel,

Fig. 3 in einer schematischen Darstellung einen anstelle des Strahlteilers verwendbaren Spiegel als separates Bauteil

Fig. 4 in einer schematischen Darstellung einen Spiegel mit integralem reflektierenden und absorbierenden Bereich.

Fig. 1 zeigt in einer schematischen Darstellung ein Ausführungsbeispiel einer optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, wobei diese Anordnung – bei dem hier gewählten Ausführungsbeispiel – zwei Laserlichtquellen 1, 2, eine im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang 3, 4, 5 angeordnete Einrichtung 6 zur Trennung des am Objekt 7 reflektierten Anregungslights 8 von dem vom Objekt 7 abgestrahlten Fluoreszenzlicht 9, eine zwischen der Einrichtung 6 und dem Objekt 7 angeordnetes Objektiv 10 und einen der Einrichtung 6 im Detektionsstrahlengang 5 nachgeordneten Detektor 11 umfaßt.

Fig. 1 läßt schematisch erkennen, daß das Anregungslicht 8 über einen Strahlvereiniger 12 zu der Einrichtung 6 gelangt, von dieser in das Objektiv 10 reflektiert wird und von dort aus zum Objekt 7 gelangt. Das Fluoreszenzlicht 9 gelangt wiederum durch das Objektiv 10 hindurch zu der Einrichtung 6, passiert diese mit Ausnahme des in erfindungsgemäßer Weise als Spiegel 13 ausgebildeten reflektierenden Bereichs und gelangt über eine Tubuslinse 14, ein Sperrfilterrad 15 und eine Detektionslochblende 16 zu dem Detektor 11.

Erfindungsgemäß umfaßt die Einrichtung 6 einen Spiegel 13, wobei der Spiegel 13 im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang 3, 4, 5 derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts 7 den von den Laserlichtquellen 1, 2 kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl bzw. das Anregungslicht 8 in das Objektiv 10 reflektiert und das vom Objekt 7 kommende Fluoreszenzlicht 9 mit voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang 4, 5 wirksamen Querschnitt des Spiegels 13 in Richtung des Detektors 11 passieren läßt.

Bei dem in den **Fig. 1** und **2** gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Einrichtung 6 als Strahlteiler ausgeführt, wobei dort mittig der Spiegel 13 integriert ist.

Fig. 3 zeigt eine alternative Ausgestaltung der Einrich-

tung 6 dahingehend, daß diese schlicht und einfach als singulärer Spiegel 13 ausgeführt ist, wobei es sich bei dem Spiegel 13 um ein eigenständiges Bauteil handelt. Der Spiegel 13 könnte eine insgesamt verspiegelte Fläche gemäß der Darstellung in Fig. 3 aufweisen.

Bei dem in Fig. 4 dargestellten Ausführungsbeispiel ist der Spiegel 13 ebenfalls als separates Bauteil ausgeführt, wobei die Fläche des Spiegels 13 in eine reflektierende Spiegelfläche 17 und in eine absorbierende Fläche 18 unterteilt ist. Durch diese Maßnahme erübriggt sich die Vorkehrung einer separaten Lichtfalle für etwa rückreflektiertes Anregungslicht 19.

Sofern als Einrichtung 6 ein Strahlteiler beispielsweise gemäß der Darstellung in den Fig. 1 und 2, aber auch eine Ausführungsform nach den Fig. 3 und 4 verwendet wird, lassen sich die Rückreflexe bzw. läßt sich das rückreflektierte Anregungslicht 19 dadurch "unschädlich" machen, daß die Probe bzw. das Objekt 7 schief gestellt, d. h. nicht orthogonal zur optischen Achse 23 angeordnet ist. Dadurch wird das rückreflektierte Anregungslicht 19 geringfügig zum Beleuchtungsstrahlengang 20 bzw. zum Strahlengang des Anregungslichts 8 versetzt, so daß das rückreflektierte Anregungslicht 19 entlang eines eigenen Strahlengangs 21 rückreflektiert wird. Dort ist an geeigneter Stelle eine Lichtfalle 22 angeordnet, die aufgrund der Ausrichtung des Strahlengangs 21 abseits des Beleuchtungsstrahlengangs 20 bzw. des Anregungslichts 8 liegt.

Hinsichtlich weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Ausführungen im allgemeinen Teil der Beschreibung verwiesen.

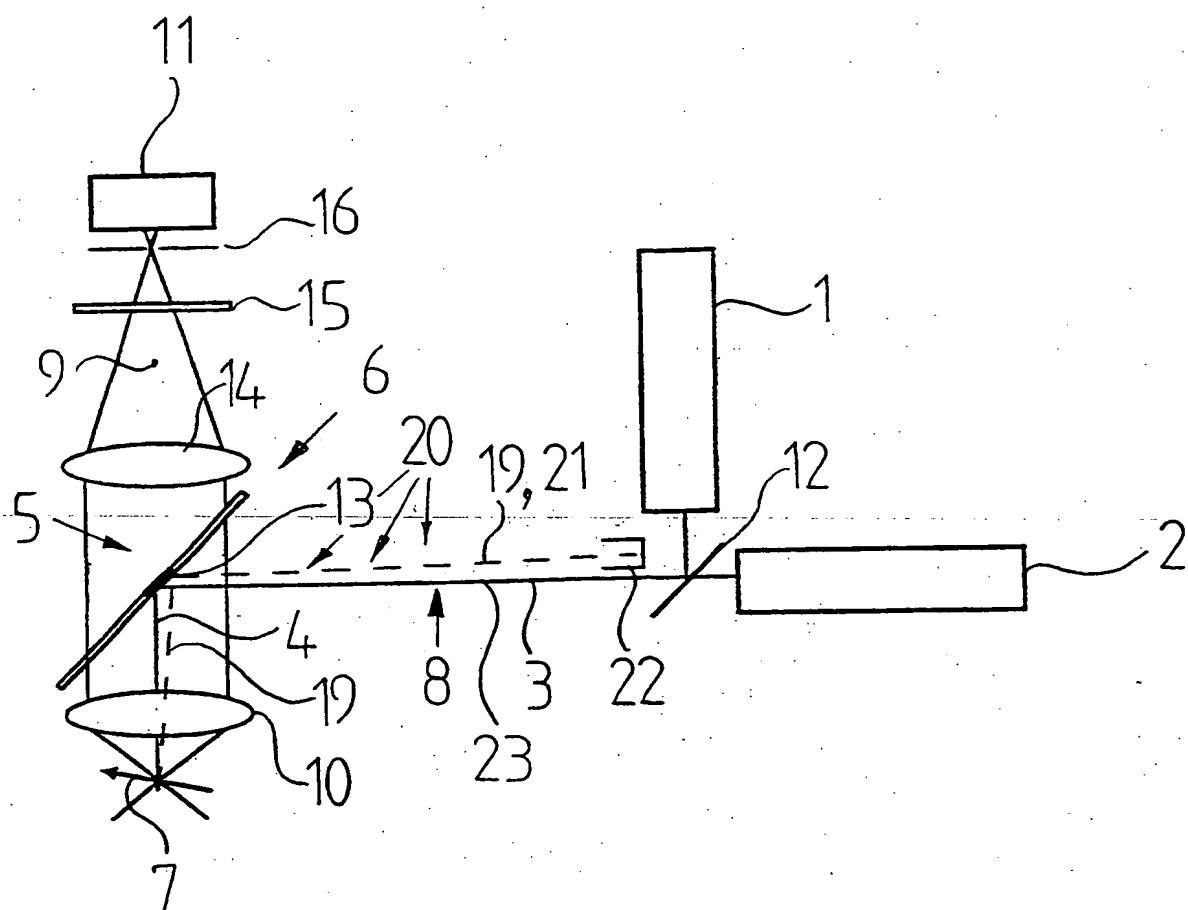
Patentansprüche

1. Optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle (1, 2), einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) angeordneten Einrichtung (6) zur Trennung des am Objekt (7) reflektierten Anregungslichts (8) von dem vom Objekt (7) abgestrahlten Fluoreszenzlicht (9), einem zwischen der Einrichtung (6) und dem Objekt (7) angeordneten Objektiv (10) und einem der Einrichtung (6) im Detektionsstrahlengang (5) nachgeordneten Detektor (11), dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (6) einen Spiegel (13) umfaßt und daß der Spiegel (13) im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts (7) den von der Laserlichtquelle (1, 2) kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungstrahl in das Objektiv (10) reflektiert und das vom Objekt (7) kommende Fluoreszenzlicht (9) mit voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang (5) wirksamen Querschnitt des Spiegels (13) – in Richtung des Detektors (11) passieren läßt.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) derart dimensioniert ist, daß er für das zu detektierende Fluoreszenzlicht (9) im Detektionsstrahlengang (5) einen Verlust von etwa einem Prozent hervorruft.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) als unabhängiges Bauteil ausgeführt ist.
4. Anordnung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) von einer Halterung getragen ist.
5. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) als vorzugsweise

integraler verspiegelter Bereich eines Strahlteilers ausgeführt ist.

6. Anordnung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) zumindest weitgehend in der Mitte des Strahlteilers angeordnet bzw. ausgebildet ist.
7. Anordnung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) in etwa rund ausgebildet ist.
8. Anordnung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) in etwa elliptisch ausgebildet ist.
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers (6) in Richtung des Detektors (11) in etwa 10% Reflexion und 90% Transmission aufweist.
10. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften des nicht spiegelnden Bereichs des Strahlteilers zumindest weitgehend temperaturunabhängig sind.
11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Unterdrückung des Rückreflexes des Anregungslichts (8) am Objekt (7) zurück in die Laserlichtquelle (1, 2) das Objekt (7) schief, d. h. nicht orthogonal zur optischen Achse (23), angeordnet ist.
12. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß für das rückreflektierte Anregungslicht (19) in dessen zum Beleuchtungsstrahlengang (20) zumindest geringfügig versetzten Strahlengang (21) eine Lichtfalle (22) vorgesehen ist.
13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Objekt (7) in seiner Ebene derart bewegbar ist, daß der beleuchtete Objektbereich stets den gleichen Abstand zu dem Objektiv (10) aufweist.
14. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (13) einen absorbierenden Bereich (18) zur Absorption des vom Objekt (7) gestreuten Anregungslichts (8) aufweist.
15. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlteiler neben dem verspiegelten Bereich einen absorbierenden Bereich (18) zur Absorption des vom Objekt (7) gestreuten Anregungslichts (8) aufweist.
16. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß durch ein geeignetes Verhältnis von Strahldivergenz zur Wellenlänge der verwendeten Laserlichtquellen (1, 2) eine zumindest annähernd gleiche Fokuslage realisierbar ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

**Fig. 1**

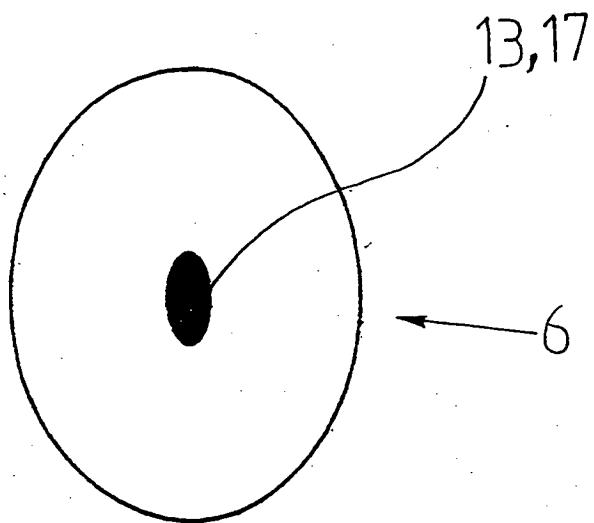


Fig. 2

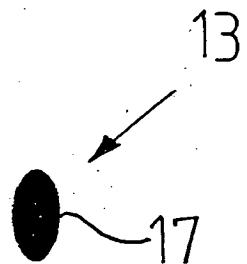


Fig. 3

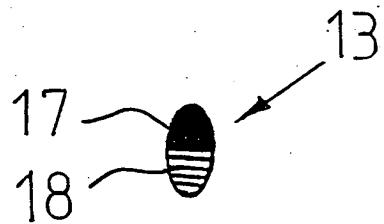


Fig. 4